

AA

Lymphocyte proliferation assay kit useful for diagnosis of Alzheimer's disease comprises an anticoagulant, one or more stimulants and an anti-CD69 antibody

Publication number: DE19936035

Publication date: 2001-02-08

Inventor: ARENDT THOMAS (DE)

Applicant: UNIV LEIPZIG (DE)

Classification:

- International: G01N33/569; G01N33/68; G01N33/569; G01N33/68;
(IPC1-7): C12Q1/02

- european: G01N33/569H2; G01N33/68V2

Application number: DE19991036035 19990730

Priority number(s): DE19991036035 19990730

RECEIVED
CENTRAL FAX CENTER

SEP 05 2006

Report a data error here

Abstract of DE19936035

Lymphocyte proliferation assay kit comprising an anticoagulant, e.g. sodium citrate or heparin, one or more stimulants, e.g. phytohemagglutinin, protein A and/or nerve growth factor and an antibody with CD69 specificity, is new. an Independent claim is also included for a lymphocyte proliferation assay comprising: (1) stabilizing venous blood by adding the anticoagulant; (2) stimulating lymphocytes by adding the stimulant(s); (3) measuring CD69 presentation before and after step (2) by adding the antibody and measuring antibody binding by fluorescence-activated cell sorting (FACS); (4) calculating a stimulation index as the ratio of CD69 presentation before and after stimulation; and (5) calculating the ratio of the stimulation indices for helper T cells and B lymphocytes.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 36 035 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
C 12 Q 1/02

②① Aktenzeichen: 199 36 035.9
②② Anmeldetag: 30. 7. 1999
②③ Offenlegungstag: 8. 2. 2001

DE 199 36 035 A 1

⑦① Anmelder:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

⑦② Erfinder:
Arendt, Thomas, Prof. Dr., 04109 Leipzig, DE

⑤② Entgegenhaltungen:
DE 198 21 060 A1
Datenbank CAPLUS bei STN, AN 1997:388105
CAPLUS
zu: Rapid expression of the CD69 antigen on T
cells and natural killer cells upon antigenic Sti-
mulation of peripheral blood mononuclear cell
suspensions. Werfel, T. et al., Allergy (Copenha-
gen) (1997), 52 (4), 465-469;
Datenbank CAPLUS bei STN, AN 1996:292751
CAPLUS
zu: Trifluoperazine reduces the expression of CD69
in phytohemagglutinin-activated lymphocytes.
Pires, V., et al., Braz. J. Med. Biol. Res. (1996),
29 (4), 479-483;
Datenbank CAPLUS bei STN, AN 1990:70840
CAPLUS zu:
Nerve growth factor induces growth and differenti-
ation of human B lymphocytes. Otten, U. et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1989), 86 (24),
10059-63;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤③ Lymphozytenproliferationstestkit
⑤④ Es wird ermöglicht, auf Lymphozyten vor und nach ei-
ner Stimulation mit PHA und/oder Protein A und/oder
NGF den Zelloberflächenmarker CD69 zu erkennen und
einen Stimulationsindex zu bestimmen.
Die ermittelten Daten sind geeignet, Rückschlüsse auf das
Vorliegen der Alzheimerschen Krankheit zu ermöglichen.

DE 199 36 035 A 1

DE 199 36 035 A 1

1

Beschreibung

Der Lymphozytenproliferationstestkit wird zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung eingesetzt. Er dient der Erfassung präklinischer Erkrankungsphasen und der differentialdiagnostischen Abgrenzung der Alzheimerschen Erkrankung gegenüber anderen Demenzen.

Die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung ist mit klinischen Mitteln sowie den zur Verfügung stehenden paraklinischen und apparativ-technischen Methoden allein nicht mit letzter Sicherheit zu stellen und bedarf daher stets der autopsischen Verifizierung. Insbesondere in Erkrankungsfrühstadien ist die differentialdiagnostische Abgrenzung anderer Demenzursachen oft schwierig. Gerade in diesen frühen Phasen der Erkrankung ist jedoch eine sichere Stellung der Diagnose aus zweierlei Gründen wichtig. Sie erlaubt zum einen die diagnostische Abgrenzung potentiell behandelbarer Demenzformen und kann diese damit einer effektiven Therapie zuführen, zum anderen ist sie Voraussetzung für jegliche Form der therapeutischen Intervention in den Prozess der Neurodegeneration der Alzheimerschen Erkrankung, der nur in diesen Frühstadien erfolgreich sein kann. Eine derartige diagnostische Sicherheit kann nur durch Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung, d. h. durch leicht zu bestimmende biologische Veränderungen mit einer für die Erkrankung hinreichenden Sensitivität und Spezifität, geleistet werden.

Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung haben damit zum einen diagnostischen Wert, und sollen hierbei insbesondere helfen, Risikogruppen bzw. Patienten in präklinischen Stadien und frühen klinischen Stadien sicher zu identifizieren. Zum anderen dienen Biomarker der Verlaufskontrolle und damit der Prognostik sowie der Kontrolle der Ansprechbarkeit auf kausal-therapeutische Interventionen. Ideale Biomarker sollten bestimmten theoretischen und praktischen Anforderungen genügen. Hierzu gehören insbesondere eine hohe Spezifität und Sensitivität, die Fähigkeit, präklinische Stadien zu identifizieren, sowie ein hoher positiver und negativer Vorhersagewert. Die Bestimmung der Biomarker sollte möglichst nicht-invasiv sein und den Patienten nicht ängstigen. Die Analysen sollten einfach durchführbar und preiswert sein.

Keiner der derzeit bekannten Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung genügt den o. a. Anforderungen. Insbesondere aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität der bekannten Biomarker sind diese als diagnostisches Hilfsmittel ungeeignet.

Es ist Aufgabe der Erfindung, einen Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung mit ausreichender Sensitivität und Spezifität anzugeben und damit ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung, die Erfassung von präklinischen Erkrankungsphasen sowie die differentialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimerschen Erkrankung gegen andere Demenzen erlaubt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch Bestimmung der CD69 Präsentation an der Oberfläche von Lymphozyten des Patienten sowie durch Bestimmung der Proliferationsrate dieser Lymphozyten nach mitogener Stimulation gelöst. Diese Merkmale zeigen erkrankungsspezifische Abweichungen vom Normbefund.

Die Erfindung beschreibt ein Merkmal (Biomarker) der Alzheimerschen Erkrankung, durch dessen Bestimmung Patienten mit dieser Erkrankung zu identifizieren sind. Damit wird ein Verfahren angegeben, welches die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung, die Erfassung von präklinischen Erkrankungsphasen sowie die differentialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimerschen Erkrankung gegen

2

andere Demenzen erlaubt.

Bisher bekannte Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung, die sich am lebenden Patienten bestimmen lassen (Biomarker) zeigen nur eine ungenügende Sensitivität und Spezifität und sind als diagnostische Hilfsmittel daher ungeeignet. Mit klinischen Mitteln beträgt die diagnostische Sicherheit nur 80% bis 90% und bereitet insbesondere in Erkrankungsfrühphasen differentialdiagnostische Schwierigkeiten. Die Erkennung von präklinischen Erkrankungsphasen ist aufgrund des Fehlens eines geeigneten Biomarkers derzeit nicht möglich.

Den neurodegenerativen Veränderungen liegen bei der Alzheimerschen Erkrankung gestörte Prozesse der intrazellulären Vermittlung trophischer und mitogener Signale zugrunde. Diese Störungen der intrazellulären Signaltransduktion sind nicht auf das Nervensystem beschränkt.

Sie lassen sich in ähnlicher Weise auch an Lymphozyten des peripheren Blutes dieser Patienten finden. Aufgrund ihrer Erkrankungsspezifität besitzt diese Veränderung diagnostischen Wert und eignet sich als Biomarker.

Die Ermittlung, ob die für die Alzheimersche Erkrankung typische Störung der intrazellulären Vermittlung trophischer und mitogener Signale vorliegt, erfolgt durch Bestimmung der CD69 Präsentation auf Lymphozyten vor und nach mitogener Stimulation. Hierfür werden Lymphozyten aus den durch Venenpunktion gewonnenen Blutproben der Patienten über einen Ficoll-Gradienten präpariert und für die weiteren Stimulationsexperimente eingesetzt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden diese Stimulationsexperimente direkt am Zitrat-Blut durchgeführt, ohne vorher Lymphozyten präparatorisch abzutrennen.

Für die Stimulationsexperimente werden Phytohaemagglutinin (PHA), Protein A und Nervenwachstumsfaktor (NGF) jeweils einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt.

Die Bestimmung des Zelloberflächenmarkers CD69 erfolgt nach Bindung von fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting). Der simultane Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Zell-spezifischen Antikörpern erlaubt die getrennte Identifikation von Leukozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, T-Helferzellen, zytotoxische und T-Suppressor-Zellen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Proliferation von Lymphozyten direkt bestimmt. Dies ist durch den Nachweis des Einbaues von radioaktiv- oder nicht-radioaktiv markierten Komponenten bzw. deren Analoga in die Lymphozyten DNA sowie durch den Nachweis anderer mit Proliferation einhergehender biologischer Phänomene möglich.

Die Erfindung wird durch folgende eingehende Beschreibung deutlicher.

1. Gewinnung von venösem Blut durch Venenpunktion und Stabilisierung durch Zugabe von Natrium citricum oder anderen geeigneten Stoffen. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden aus diesen Blutproben über einen Ficoll-Gradienten Lymphozyten durch Zentrifugation präparatorisch abgetrennt.
2. Stimulation der Lymphozyten im Zitrat-Blut oder der präparatorisch isolierten Lymphozyten durch einzelne oder kombinierte Zugabe von Phytohaemagglutinin (PHA), Protein A, und Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder andere trophisch oder mitogen wirksamer Substanzen.
3. Ermittlung der CD69 Präsentation durch Bestimmung von Antikörperbindung mittels FACS (Fluores-

DE 199 36 035 A 1

3

cence activated cell sorting) oder durch eine andere geeignete Methode vor sowie nach Stimulation.

4. Simultane Identifikation unterschiedlicher Zelltypen durch Einsatz Zelltypspezifischer Antikörper und Bestimmung deren Bindung mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting) oder durch eine andere geeignete Methode.

5. Rechnerische Ermittlung des Verhältnisses (Stimulationsindex) der CD69 Präsentation auf T-Helferzellen vor und nach Stimulation sowie auf B-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit PHA.

6. Rechnerische Ermittlung des Verhältnisses der Stimulationsindices von T-Helferzellen und B-Lymphozyten.

7. In weiteren Ausführungsformen der Erfindung werden jeweils die Präsentation von CD69 an anderen Zelltypen zugrunde gelegt und es werden jeweils alternative Rechenoperationen (Division, Subtraktion, Addition, Multiplikation) ausgeführt.

8. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Veränderung der intrazellulären Signaltransduktion und des zellulären Proliferationsverhaltens durch den Nachweis des Einbaues von radioaktiv- oder nicht-radioaktiv markierten Komponenten bzw. deren Analoga in die Lymphozyten DNA sowie durch den Nachweis anderer mit Proliferation eingehender biologischer Phänomene bestimmt.

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1

Rechnerische Ermittlung des Verhältnisses (Stimulationsindex) der CD69 Präsentation auf T-Helferzellen vor und nach Stimulation sowie auf B-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit PHA

Links: Patient mit Alzheimerscher Erkrankung (AD)
Rechts: klinisch gesunder Kontrollproband

Abb. 2

Diagnostische Sensitivität für die Alzheimersche Erkrankung

Ausführungsbeispiel

1. Gewinnung von venösem Blut durch Venenpunktion und Stabilisierung durch Zugabe von Natriumcitricum oder Heparin oder anderen geeigneten Stoffen. [In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden aus diesen Blutproben über einen Ficoll-Gradienten Lymphozyten durch Zentrifugation präparativ abgetrennt.]

2. Zugabe von Phytohaemagglutinin (PHA), [Protein A, und Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder anderer trophisch oder mitogen wirksamer Substanzen.] zu dem Zitrat-Blut oder den präparativ isolierten Lymphozyten. Hierdurch werden die Lymphozyten stimuliert und gehen in die Proliferation über, deren frühes Kennzeichen die Präsentation von CD69 auf der Zelloberfläche ist. Ein Teil der Blutprobe[oder der präparativ isolierten Lymphozyten] wird vor der Stimulation abgetrennt und dient in den weiteren Messungen als unstimulierter Bezugswert.

3. Markierung der CD69 Präsentation durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, die spezifisch CD69 erkennen. Quantifizierung der Intensität der Fluoreszenzmarkierung bzw. der Anzahl fluoreszenz-

4

markierter Zellen z. B. mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting).

Der simultane Einsatz Zelltypspezifischer Antikörper erlaubt gleichzeitig die Identifikation unterschiedlicher Zelltypen und damit die differenzielle Erfassung der CD69-Markierung unterschiedlicher Zelltypen. Gleichzeitig erfolgt die Quantifizierung der CD69 Präsentation an der unstimulierten Probe zur Bestimmung des Bezugswertes.

4. Rechnerische Ermittlung des Verhältnisses (Stimulationsindex) der CD69 Präsentation auf T-Helferzellen vor und nach Stimulation sowie auf B-Lymphozyten vor und nach Stimulation mit PHA (siehe Abbildung). Da die Meßwerte der klinisch gesunden Kontrollprobanden als auch der Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung auf Grund individueller Abweichungen um einen bestimmten Wert streuen, macht sich für die diagnostische Beurteilung der Meßergebnisse die Definition von Grenzwerten notwendig. Die exakte Lage dieser Grenzwerte unterliegt dem wissenschaftlichen Fortschritt. In der unten dargestellten Abbildung ist eine Möglichkeit der Interpretation der Meßwerte dargestellt. Die Stimulationsindices von T- und B-Zellen werden im Koordinatensystem auf unterschiedlichen Achsen aufgetragen. Diese Art der zweidimensionalen Darstellung erhöht die Trennschärfe zwischen dem pathologischen und dem normalen Wertebereich, die in vorliegender Darstellung durch eine Diagonale gekennzeichnet ist. Der Hinweis auf das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer Alzheimerschen Erkrankung ergibt aus dem Bereich, in dem der individuelle Meßwert liegt. Bei den unten dargestellten Meßwerten von 19 Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung und 24 klinisch gesunden Normalprobanden ergibt sich für die Alzheimersche Erkrankung eine diagnostische Sensitivität von 89,5% und eine diagnostische Spezifität von 79,2%.

Patentansprüche

1. Lymphozytenproliferationstestkit, bestehend aus
 - koagulationshemmenden Adjuvantien, wie Natriumcitrat oder Heparin oder anderen geeigneten Stoffen
 - Stimulierungsmitteln wie Phytohaemagglutinin (PHA), Protein A, Nervenwachstumsfaktor (NGF)
 - ein Antikörper mit CD-69-Spezifität.
2. Verwendung des Testkits nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
 - venöses Blut durch Zugabe von Natriumcitrat stabilisiert wird,
 - die Lymphozyten stimuliert werden durch einzelne oder kombinierte Zugabe von Stimulierungsmitteln wie Phytohaemagglutinin (PHA), Protein A, Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder andere trophisch oder mitogen wirkende Substanzen,
 - die CD69-Präsentation auf den Lymphozyten durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers fixiert und vermessen wird,
 - wobei dies vor und nach der Stimulation der Lymphozyten erfolgt,
 - die Antikörperbindung mittels FACS vermessen wird,
 - der Stimulationsindex als Verhältnis der CD69-Präsentation vor und nach der Stimulation be-

DE 199 36 035 A 1

5

6

- stimmt wird,
- das Verhältnis der Stimulationsindices von T-Helferzellen und B-Lymphozyten errechnet wird.
3. Verwendung des Testkits nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Lymphozyten über einen Ficoll-Gradienten durch Zentrifugieren präpariert werden. 5
4. Verwendung des Testkits nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass andere Zelltypen als Lymphozyten verwendet werden, zum Beispiel T-Helferzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, zytotoxische und T-Suppressor-Zellen. 10
5. Verwendung des Testkits nach Anspruch 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Zelloberflächenmarkers CD69 simultan durch Verwendung fluoreszenzfarbstoff-markierter zellspezifischer Antikörper erfolgt. 15
6. Verwendung des Testkits nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass monoklonale Antikörper eingesetzt werden. 20
7. Verwendung des Testkits nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als trophisch wirkende Substanzen Nervenwachstumsfaktor oder andere geeignete Neurotrophine eingesetzt werden. 25
8. Verwendung des Testkits nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als mitogen wirkende Substanzen Protein A, Phytohaemagglutinin oder andere geeignete Mitogene eingesetzt werden. 30
9. Verwendung des Testkits nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass andere, in die Lymphozyten DNA eingebaute, leicht nachweisbare Komponenten vor und nach der Stimulation bestimmt werden. 35
10. Verwendung des Testkits nach Anspruch 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass die leicht nachweisbare Komponente eine radioaktiv markierte DNA ist. 40

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:

DE 199 38 035 A1

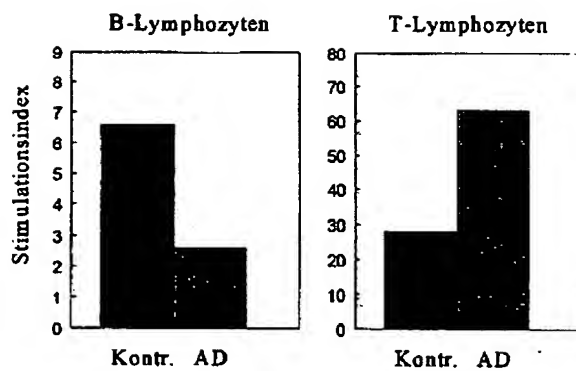
Int. Cl. 7:

C 12 Q 1/02

Offenlegungstag:

8. Februar 2001

Abbildung 1



BEST AVAILABLE COPY

002 066/506

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:

DE 199 36 035 A1

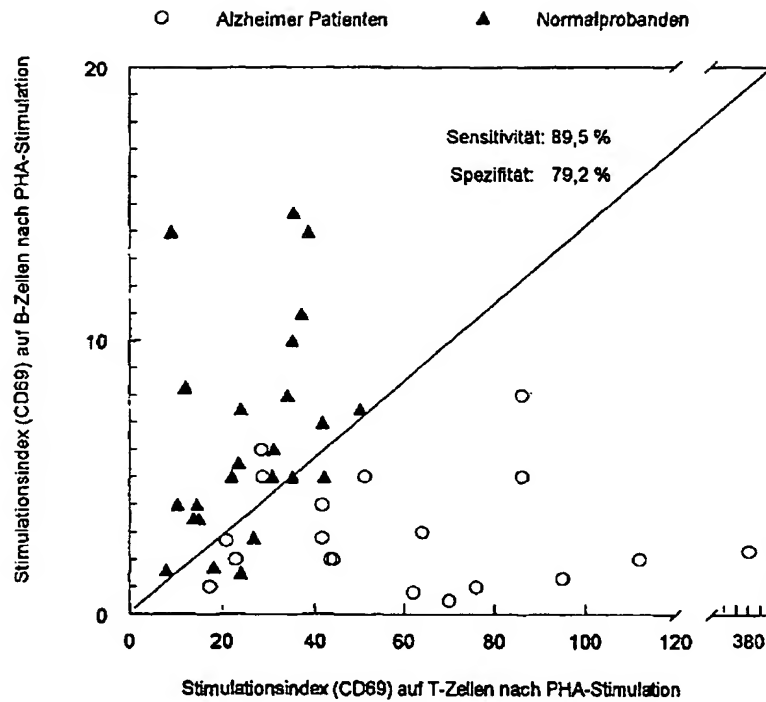
Int. Cl. 7:

C 12 Q 1/02

Offenlegungstag:

8. Februar 2001

Abbildung 2



BEST AVAILABLE COPY

002 066/506